

キネシン CENP-E の構造解析とその機能の解明

Structure determination and elucidation of function of kinesin spindle protein CENP-E

渋谷明日香¹, 横山英志^{1,*}¹ 東京理科大学大学院 薬学研究科

〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

Asuka SHIBUYA¹ and Hideshi YOKOYAMA^{1,*}¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba, 278-8510, Japan

1 背景

がんは日本の死因 1 位の疾患であるため、新たな抗がん剤の開発が求められている。そこで、がん治療の新たな標的分子として注目されているのが、細胞分裂において染色体集合などの重要な役割を担うキネシン Centromere-associated protein E (CENP-E) である。これは、adenosine 5'-triphosphate (ATP) 駆動性モータータンパク質である [1]。CENP-E の阻害剤には不競合阻害剤 GSK923295, 競合阻害剤 3-chloro-4-isopropoxyl benzoic acid (CIBA) などがある [2]。このうち GSK923295 は臨床試験第 I 相が終了しており、既存の抗がん剤よりも副作用が少ないことが報告されている。阻害剤の設計は、結晶構造を基にした合理的なアプローチが最適であるが、CENP-E モータードメインと阻害剤の複合体の結晶構造が未だに解明されていないため、既存の阻害剤よりも阻害効果の強い阻害剤の作製は難しい状況である。そこで今回我々は、CENP-E モータードメインと阻害剤複合体の X 線結晶構造解析を行うために、調製から結晶化までの条件検討を行い、構造を決定した。

2 実験方法

ヒト CENP-E モータードメイン (1-339 残基、C 末に His tag を付与) を、低温発現が可能な pCold III ベクターに組み込んだ。これを用いて大腸菌 BL21(DE3) Codon Plus RIL を形質転換して培養し、タンパク質を大量発現した。菌体破碎後、Ni affinity、陽イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた三段階の精製を行った。溶出液を濃縮後、競合阻害剤 CIBA または ATP アナログを添加し、共結晶化を試みた。得られた結晶に、BL-17A で X 線を照射し、回折像を収集した。プロセッシングとスケーリングは XDS と SCALA を用いて行った。構造は CCP4 suite の中の MOLREP を用いて、分子置換法で決定された。その初期モデルは、マグネシウムイオンと ADP とが結合している CENP-E (PDB ID: 1T5C) を用いた [3]。構造の精密化は REFMAC 5 と PHENIX を用いて行った。構造モデルは COOT を用いて構築した。Ramachandran plot は MolProbity で計算した。

3 結果および考察

共結晶化して得られた 4 つの結晶を用いて BL-17A で X 線を照射したところ、最大分解能 1.9~2.0 Å の回折像が得られた。そのうち最大分解能 1.9 Å のものについて解析した。

その結果、調製段階で添加した CIBA の代わりに、添加していない ADP の電子密度がヌクレオチド結合部位に見られた。決定した CENP-E モータードメインの構造は、CIBA との複合体ではなく、MgADP と結合したものであった。また非対称単位あたり 2 分子含まれていた。今回の研究での構造と、既に報告された CENP-E-MgADP 構造 (PDB code 1T5C; [3]) (以下 CENP-E-MgADP 1T5C) の α を重ね合わせた時の r.m.s.d. 値は 0.73 Å であったことから、概ね構造が類似していたことが明らかになった。この結果から、結合していた ADP は CENP-E モータードメインを発現した細菌由来のものであること、そして調製した CENP-E モータードメインは、ADP と結合した状態を保持していたため、目的の CIBA と結合できなかったと考察した。また以上の結果は、CENP-E が細胞分裂において機能する ATPase 反応において ADP の解離が律速段階である可能性を示唆している。そこで今後 ADP を解離させ阻害剤を添加する手法の検討を進める予定である。

謝辞

本研究は、フotonファクトリーのスタッフの方々の協力のもと行いました。この場をお借りして御礼を申し上げます。

参考文献

- [1] H. Sardar *et al.*, *J. Biol. Chem.* **287**, 24894 (2012)
- [2] X. Qian *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 30 (2010)
- [3] Garcia-Saez *et al.*, *J. Mol. Biol.* **340**, 1107 (2004)
- [4] A. Shibuya *et al.*, *Acta Cryst.* **D77**, 280 (2021)

* yokoyama@rs.tus.ac.jp